

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. November 2001 (29.11.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/89569 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 45/06,**
A61P 37/06, 35/00 // (A61K 38/55, 38:55)

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP01/05887**

(22) Internationales Anmeldedatum:
22. Mai 2001 (22.05.2001)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
100 25 464.0 23. Mai 2000 (23.05.2000) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **INSTITUT FÜR MEDIZINTECHNOLOGIE
MAGDEBURG GMBH IMTM [DE/DE];** Leipziger
Strasse 44, 39120 Magdeburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ANSORGE, Siegfried**
[DE/DE]; Am Sportplatz 17, 39291 Hohenwarthe (DE).

ARNDT, Marco [DE/DE]; Wernsdorfer Strasse 2, 06217
Merseburg (DE). **BÜHLING, Frank [DE/DE];** Annas-
trasse 14, 39108 Magdeburg (DE). **LENDECKEL, Uwe**
[DE/DE]; An der Waldschule 8 a, 39128 Magdeburg
(DE). **NEUBERT, Klaus [DE/DE];** Brunner Strasse 22
a, 06128 Halle/Saale (DE). **REINHOLD, Dirk [DE/DE];**
Goethestrasse 6, 39108 Magdeburg (DE).

(74) Anwalt: **KOEPE, Gerd, L.;** Koepe, Fiesser & Partner,
Radeckestrasse 43, 81245 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: **COMBINATIONS OF ENZYME INHIBITOR-CONTAINING PREPARATIONS AND THE USE THEREOF**

(54) Bezeichnung: **KOMBINATIONEN VON ENZYMINHIBITOREN UMFASSENDE ZUBEREITUNGEN UND DEREN VER-
WENDUNG**

(57) Abstract: The invention relates to a method which permits, owing to the simultaneous and joint inhibition of the enzyme activities of (I) alanyl-aminopeptidase and dipeptidyl-peptidase IV, (II) of the dipeptidyl-peptidase IV and the angiotensin-converting enzyme, (III) of the dipeptidyl-peptidase IV and prolyl-oligopeptidase, and of (IV) the dipeptidyl-peptidase IV and the X-Pro-aminopeptidase, to inhibit DNA synthesis and thus the proliferation of mononuclear cells as well as of T cells to an extent which cannot be obtained by the individual application of said enzyme inhibitors even when used in higher doses. Although the above-mentioned inhibitors influence the same process, namely DNA synthesis and thus the proliferation of immune cells, this effect is not complete and not long-lasting when the inhibitors are used individually. The functional overlapping of the enzymatic activities results, as is supported by the experimental data, in an additive/super-additive inhibitory effect on DNA synthesis and the proliferation resulting from the simultaneous inhibition of a plurality of the above enzymes. The invention shows that the simultaneous application of inhibiting substances of the above-mentioned enzymes or of corresponding preparations and forms of administration is suitable for the therapy of autoimmune diseases and chronic diseases with an inflammatory genesis as well as for the treatment of post-transplant rejection episodes.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung beinhaltet ein Verfahren, bei dem durch die gleichzeitige und gemeinsame Hemmung von Enzymaktivitäten der: I) Alanyl-Aminopeptidase und Dipeptidylpeptidase IV; II) der Dipeptidylpeptidase IV und des Angiotensin-Konvertierenden Enzyms; III) der Dipeptidylpeptidase IV und Prolyl-oligopeptidase sowie IV) der Dipeptidylpeptidase IV und der X-Pro-Aminopeptidase die DNS-Synthese und damit die Proliferation von mononukleären Zellen (MNZ) als auch von T-Zellen in einem Ausmaß hemmt, das durch die einzelne Applikation dieser Enzyminhibitoren auch bei höherer Dosierung nicht erreicht werden kann. Obgleich die genannten Inhibitoren letztendlich den gleichen Prozess, nämlich die DNS-Synthese und damit die Proliferation von Immunzellen, beeinflussen, ist dieser Effekt bei einzelner Applikation der Inhibitoren nicht vollständig und nicht dauerhaft. Aus der funktionellen Überschneidung der enzymatischen Aktivitäten resultiert, wie unsere Daten zeigen, eine additive/superadditive Hemmwirkung auf DNS-Synthese und Proliferation aus der gleichzeitigen Hemmung mehrerer der genannten Enzyme. Unsere Erfindung zeigt, dass zur Therapie von Autoimmun- und chronischen Erkrankungen mit entzündlicher Genese sowie zur Behandlung von Abstoßungsepisoden nach Transplantation die gleichzeitige Applikation von Hemmstoffen der oben genannten Enzyme bzw. entsprechender Zubereitungen und Darreichungsformen daraus geeignet sind.

WO 01/89569 A1



TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Kombinationen von Enzyminhibitoren umfassende Zubereitungen
und deren Verwendung

Beschreibung:

Die Erfindung beschreibt die kombinierte Hemmung von Enzymaktivitäten der Aminopeptidase N (APN, EC3.4.11.2, CD13), der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, EC 3.4.14.5, CD26), der Prolyl oligopeptidase (POP, Prolylendopeptidase, PEP, EC3.4.21.26), der membranständigen Aminopeptidase P (X-Pro-Aminopeptidase, APP, XPNPEP2, EC 3.4.11.9) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms, (angiotensin-converting enzyme, ACE, EC 3.4.15.1, CD156) durch die simultane Applikation von jeweils spezifischen Inhibitoren dieser Enzyme auf der Basis von Aminosäurederivaten, Peptiden oder Peptidderivaten, durch welche die Aktivierung, die DNS-Synthese und damit die Proliferation von Immunzellen supprimiert wird.

Für alle Erkrankungen mit Autoimmunpathogenese gilt, dass eine Aktivierung und Proliferation von Immunzellen, insbesondere von autoreaktiven T-Zellen, dem Krankheitsprozess zugrunde liegen bzw. diesen ausmachen. Die gleichen Mechanismen kommen bei akuten bzw. chronischen Abstoßungsepisoden nach Organtransplantation zur Wirkung.

Es ist gezeigt worden, dass im Prozess der Aktivierung und klonalen Expansion von Immunzellen, insbesondere von T-Lymphozyten, membranständige Peptidasen wie DP IV oder APN eine Schlüsselrolle spielen [Fleischer B: CD26 a surface protease involved in T-cell activation. *Immunology Today* 1994; 15:180-184; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells. *International Journal of Molecular Medicine* 1999; 4:17-27; Riemann D et al.: CD13 - not just a marker in leukemia typing. *Immunology Today* 1999; 20:83-88]. Verschiedene Funktionen mitogen-stimulierter mononukleärer Zellen (MNZ) oder angereicherter T-Lymphozyten wie DNS-Synthese, Produktion und Sekretion von immunstimulierenden Zytokinen (IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ) und Helferfunktionen für B-Zellen (IgG- und IgM-Synthese) können in Gegenwart von spezifischen Inhibitoren der DP IV und der APN gehemmt werden [Schön E et al.: The dipeptidyl peptidase IV, a membrane enzyme involved in the proliferation of T lymphocytes. *Biomed. Biochim. Acta* 1985; 2: K9-K15; Schön E et al.: The role of dipeptidyl peptidase IV in human T lymphocyte activation. Inhibitors and antibodies against dipeptidyl peptidase IV suppress lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis in vitro. *Eur. J. Immunol.* 1987; 17: 1821-1826; Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. *Immunology* 1997; 91: 354-360; Lendeckel U et al.: Induction of the membrane alanyl aminopeptidase gene and surface expression in human T-cells by mitogenic activation. *Biochem. J.* 1996; 319: 817-823; Kähne T et al.: Dipeptidyl peptidase IV: A cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (Review). *Int. J. Mol. Med.* 1999; 4: 3-15; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (Review). *Int. J. Mol. Med.* 1999; 4: 17-27].

Es ist bereits bekannt, dass die Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen durch die Hemmung der auf Immunzellen lokalisierten Dipeptidylpeptidase IV mittels synthetischer Inhibitoren teilweise möglich ist (z.B. EP764151A1, WO09529691, EP731789A1, EP528858). Für die Enzyme

Aminopeptidase N, „angiotensin-converting enzyme“, X-Pro-Aminopeptidase und Prolyl oligopeptidase sind solche Effekte bisher nicht bekannt.

Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, dass die gleichzeitige Hemmung der enzymatischen Aktivitäten von (I) Dipeptidylpeptidase IV und Aminopeptidase N, (II) der Dipeptidylpeptidase IV und des „angiotensin-converting enzym“, (III) der Dipeptidylpeptidase IV und der Prolyl oligopeptidase sowie (IV) der Dipeptidylpeptidase IV und der X-Pro-Aminopeptidase die DNS-Synthese und damit die Proliferation von mononukleären Zellen (MNZ) als auch von T-Zellen in einem Ausmaß hemmt, das durch die einzelne Applikation dieser Enzyminhibitoren - auch bei höherer Dosierung - nicht erreicht werden kann. Obgleich die genannten Inhibitoren letztendlich den gleichen Prozess, nämlich die **DNS-Synthese und damit die Proliferation** von Immunzellen, beeinflussen, ist dieser **Effekt bei einzelner Applikation der Inhibitoren wesentlich schwächer ausgeprägt und nicht dauerhaft**. Wegen der funktionellen Überschneidung der enzymatischen Aktivitäten der genannten Enzyme resultiert, wie unsere Daten zeigen, eine superadditive Hemmwirkung auf DNS-Synthese und Proliferation aus der gleichzeitigen Hemmung von zwei oder mehreren dieser Enzyme.

Unsere Erfindung zeigt, dass zur Therapie von Autoimmun- und entzündlichen Erkrankungen sowie zur Behandlung von Abstoßungsepisoden nach Transplantation die gleichzeitige Applikation von Hemmstoffen der oben genannten Enzyme bzw. entsprechender Zubereitungen und Darreichungsformen daraus geeignet sind.

Im einzelnen liegen der Erfindung die Befunde zugrunde, dass die DNS-Synthese von MNZ und T-Zellen durch die simultane Administration von Inhibitoren der enzymatischen Aktivität von

- I. Dipeptidylpeptidase IV und Aminopeptidase N,
 - II. Dipeptidylpeptidase IV und Angiotensin-konvertierendem Enzym,
 - III. Dipeptidylpeptidase IV und Prolyl oligopeptidase
 - IV. Dipeptidylpeptidase IV und X-Pro-Aminopeptidase
- in superadditiver Weise inhibiert wird.

Die Applikation von Enzyminhibitoren stellt bei den genannten Erkrankungen eine neuartige Methode und ergänzende Therapieform dar.

Die erfindungsgemäß applizierten Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV, der Aminopeptidase N, der Prolyloligopeptidase, des „angiotensin-converting enzym“ und der X-Pro-Aminopeptidase können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, inhibitorisch wirkende Peptide und Peptidderivate sowie als Antikörper dieses Enzyms zur Anwendung kommen. Bevorzugte Effektoren sind beispielsweise für die DP IV Xaa-Pro-Dipeptide, entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)_n-Peptide (n=0-10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine α -Aminosäure/Iminosäure bzw. ein α -Aminosäurederivat/Iminosäurederivat, vorzugsweise N^ε-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z.B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate. Derartige Verbindungen und deren Herstellung wurden in einem früheren Patent beschrieben (K. Neubert et al. DD296075A5).

Die Inhibitoren werden simultan mit bekannten Trägerstoffen verabreicht. Die Verabreichung erfolgt einerseits als topische Applikation in Form von z.B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln einschließlich instilativer Applikation und andererseits als systemische Applikation zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären Anwendung in geeigneten Rezepturen bzw. in geeigneter Galenik.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Inhibierung der DNS-Synthese von humanen T-Lymphozyten durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der APN

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner peripherer T-Lymphozyten durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid = I49) und APN (Actinonin) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die T-Zellen wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der ³[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abbildung 1 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

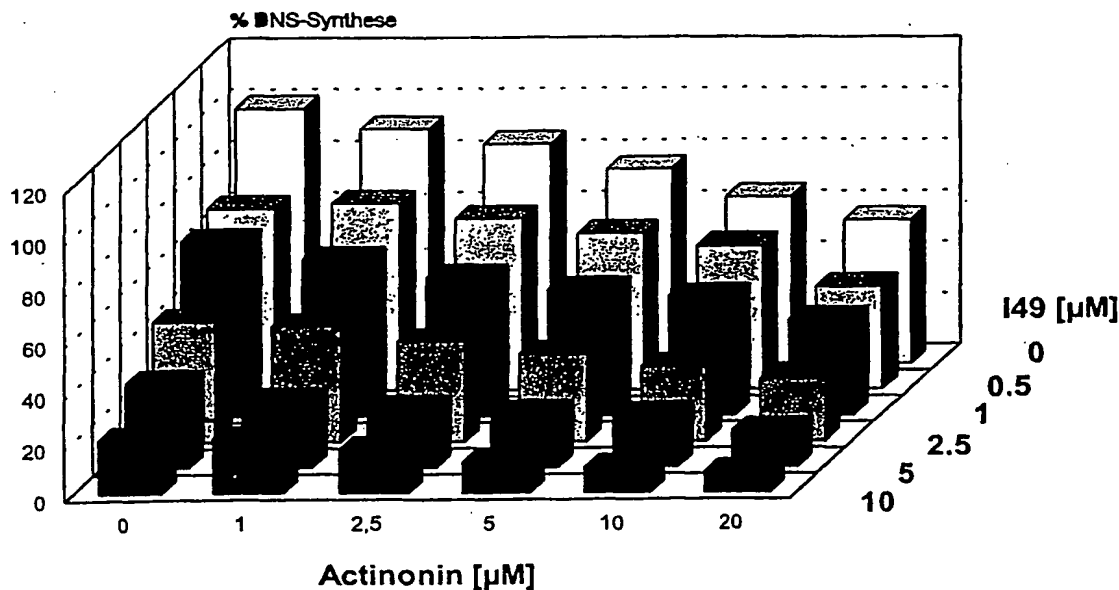


Abb. 1: Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der Aminopeptidase N (Actinonin) auf die DNS-Synthese humaner T-Lymphozyten. Humane periphere T-Zellen wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium ³[H]-Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an ³[H]-Thymidin gemessen.

Beispiel 2

Inhibierung der DNS-Synthese von humanen peripheren mononukleären Zellen durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der APN

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner peripherer mononukleärer Zellen (MNZ) durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid = I49) und APN (Actinonin) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die MNZ wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der ³[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abbildung 2 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

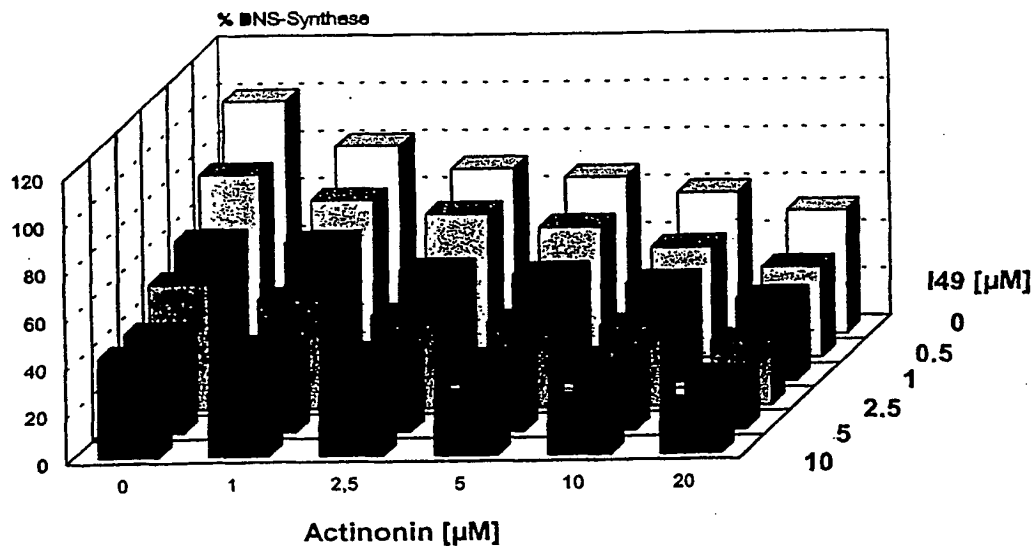


Abb. 2: Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der APN (Actinonin) auf die DNS-Synthese humaner mononukleärer Zellen (MNZ). Humane MNZ wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium ³[H]-Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an ³[H]-Thymidin gemessen.

Beispiel 3

Inhibierung der DNS-Synthese von humanen T-Lymphozyten durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der POP

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner T-Lymphozyten durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid = I49) und der Prolyl oligopeptidase (Boc-Ala-Thiazolidid) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die T-Zellen wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der ³[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abbildung 3 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

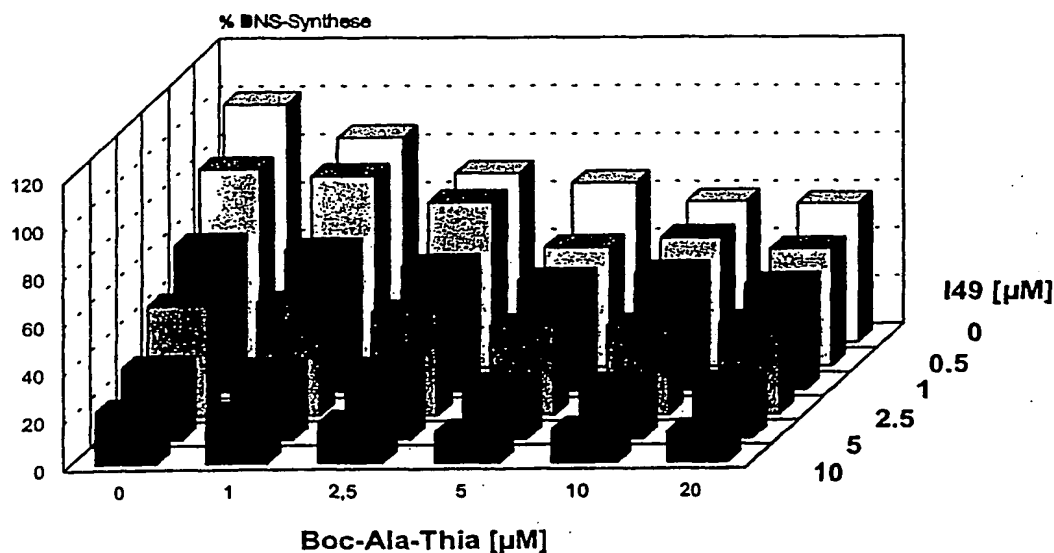


Abb. 3: Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der Prolyl oligopeptidase (Boc-Ala-Thia) auf die DNS-Synthese humaner peripherer T-Lymphozyten. Humane T-Zellen wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium ³[H]-Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an ³[H]-Thymidin gemessen.

Beispiel 4**Inhibierung der DNS-Synthese von humanen peripheren mononukleären Zellen durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der POP**

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner peripherer mononukleärer Zellen (MNZ) durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid = I49) und der Prolyl oligopeptidase (Boc-Ala-Thiazolidid) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die MNZ wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der ³[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abbildung 4 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

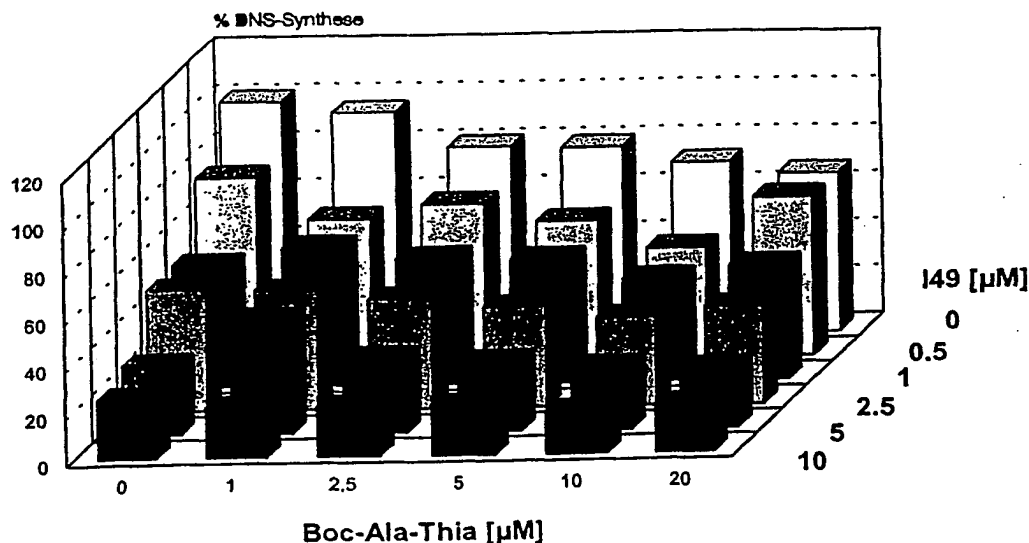


Abb. 4: Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der Prolyl oligopeptidase (Boc-Ala-Thia) auf die DNS-Synthese humaner mononukleärer Zellen (MNZ). Humane MNZ wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium ³[H]-Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an ³[H]-Thymidin gemessen.

Beispiel 5**Inhibierung der DNS-Synthese von humanen T-Lymphozyten durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und des ACE**

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner T-Lymphozyten durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid = I49) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (Captopril) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die T-Zellen wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der ³[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abbildung 5 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

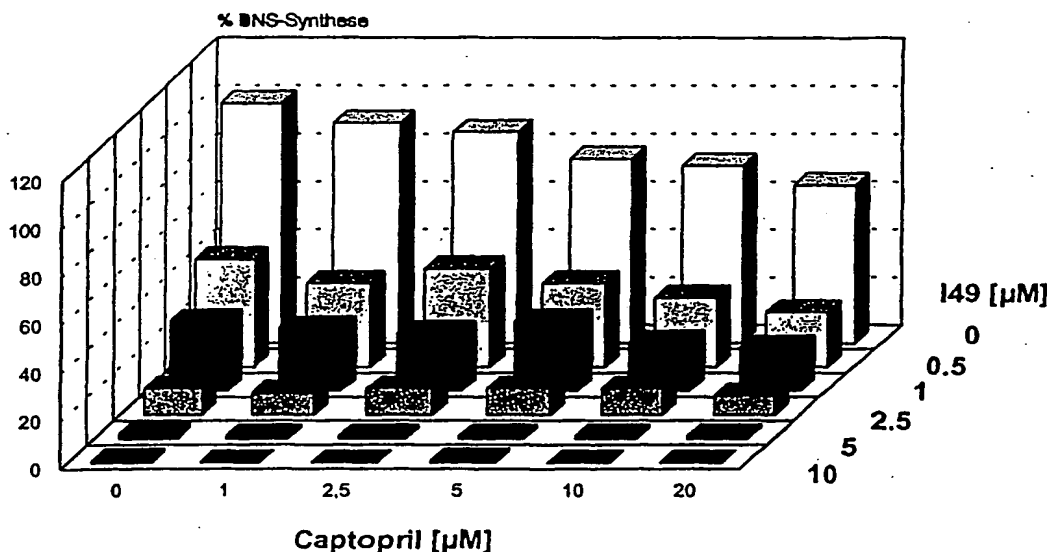


Abb. 5: Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (Captopril) auf die DNS-Synthese humaner peripherer T-Lymphozyten. Humane T-Zellen wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium ³[H]-Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an ³[H]-Thymidin gemessen.

BEST AVAILABLE COPY

Beispiel 6**Inhibierung der DNS-Synthese von humanen peripheren mononukleären Zellen durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und des ACE**

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner peripherer mononukleärer Zellen (MNZ) durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid = I49) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (Captopril) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die MNZ wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der ³[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abbildung 6 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

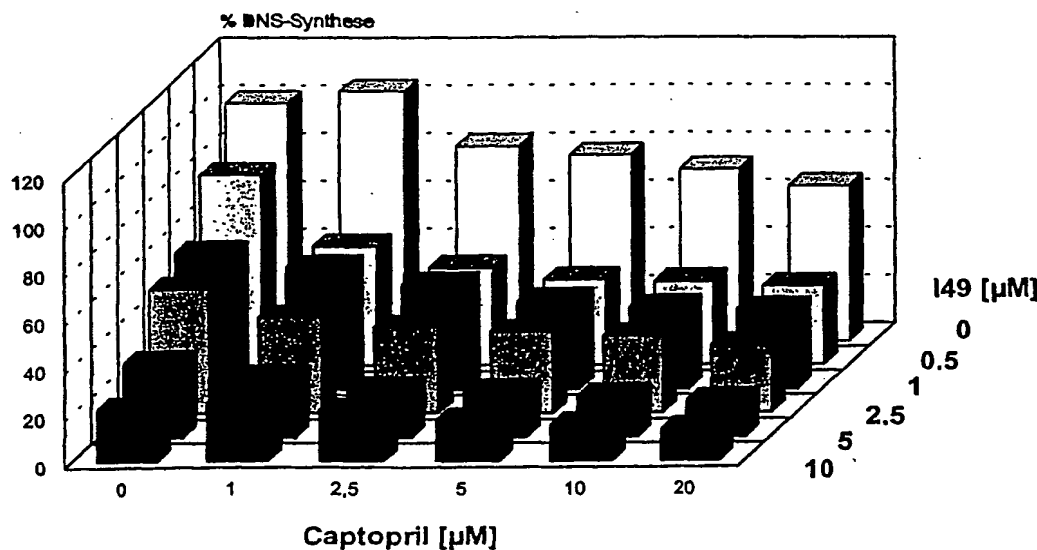


Abb. 6: Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (Captopril) auf die DNS-Synthese humaner mononukleärer Zellen (MNZ). Humane MNZ wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium ³[H]-Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an ³[H]-Thymidin gemessen.

Beispiel 7

Hemmung der Proliferation von humanen peripheren mononukleären Zellen (MNZ) durch die einzelne und gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der DP IV (I49 = Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid) und APN (Actinonin).

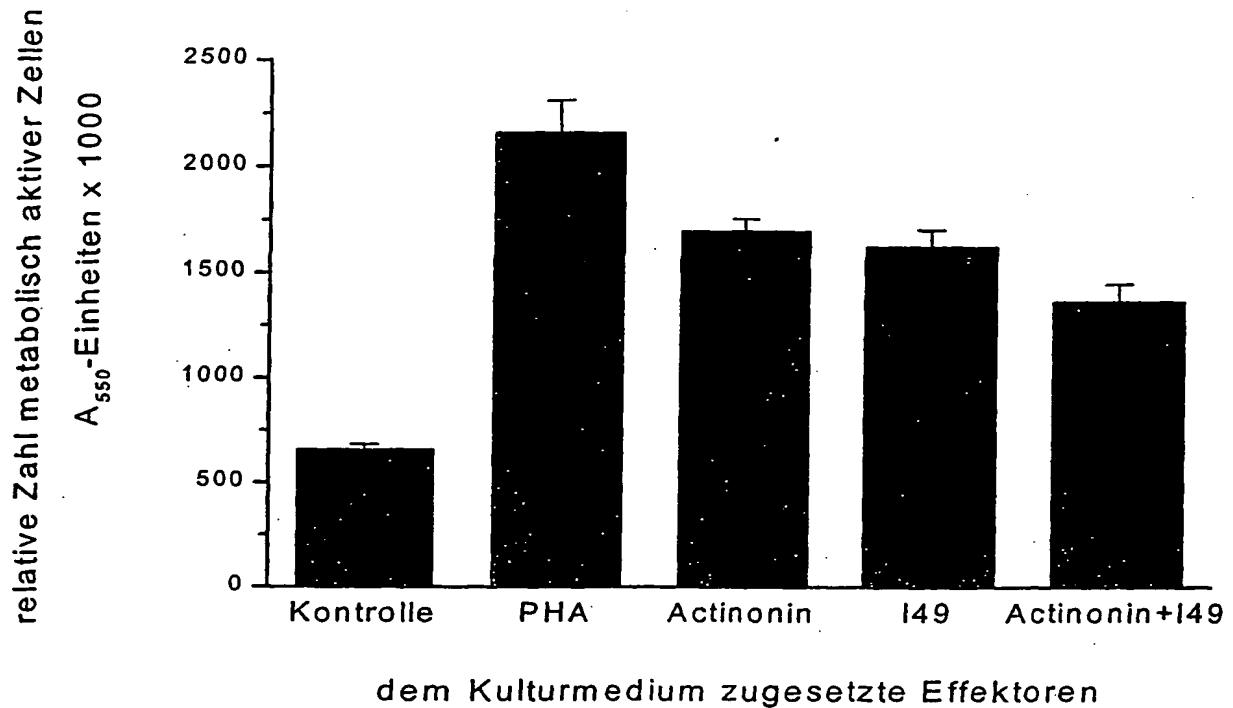


Abb. 7: Die MNZ wurden über einen Zeitraum von 72 h ohne Zusatz (Kontrolle), mit dem mitogenen Lektin Phytohämagglutinin (PHA) bzw. mit PHA und den angegebenen Inhibitoren inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter Verwendung des kommerziell verfügbaren WST-1 Zell-Proliferations-Assays (Takara Inc.) nach Angaben des Herstellers.

BEST AVAILABLE COPY

Beispiel 8

Hemmung der Proliferation der humanen T-Zelllinie KARPAS-299 durch die einzelne und gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der DP IV (I49 = Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid) und APN (Actinonin und Probestin).

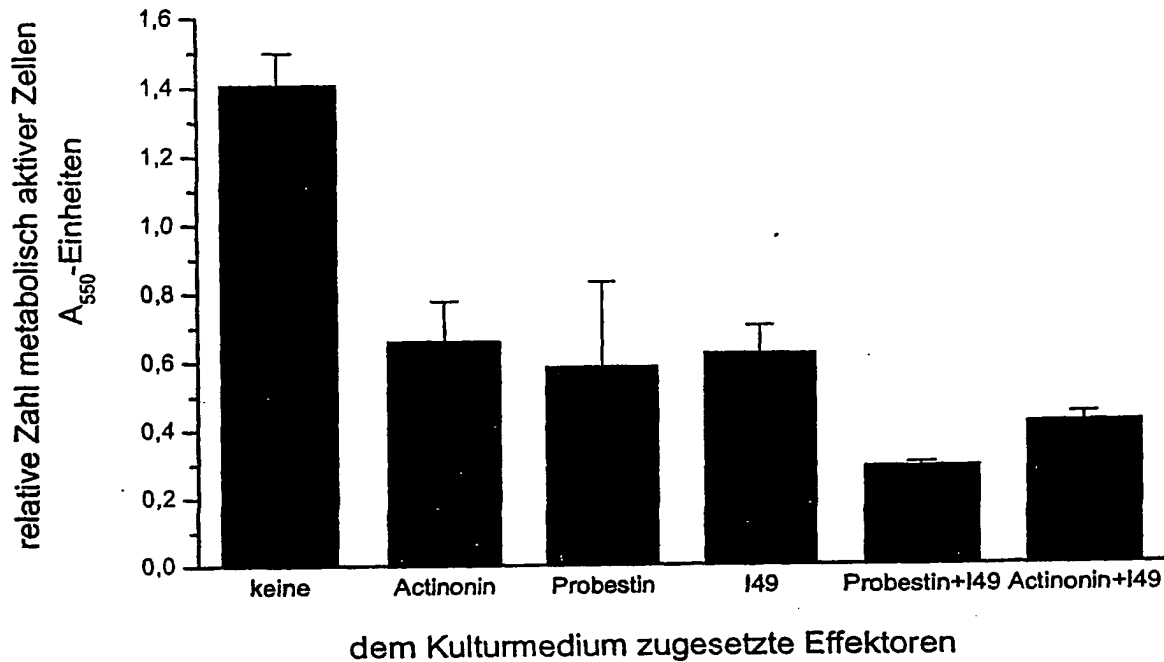


Abb. 8: Die KARPAS-299-Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 h ohne Zusatz (Kontrolle) bzw. in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren einzeln sowie in Kombination inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter Verwendung des kommerziell verfügbaren WST-1 Zell-Proliferations-Assays (Takara Inc.) nach Angaben des Herstellers.

Beispiel 9

Hemmung der Proliferation aktivierter, humaner peripherer T-Zellen durch die einzelne bzw. gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der DP IV (I49 = Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid) und APN (Actinonin und Probestin).

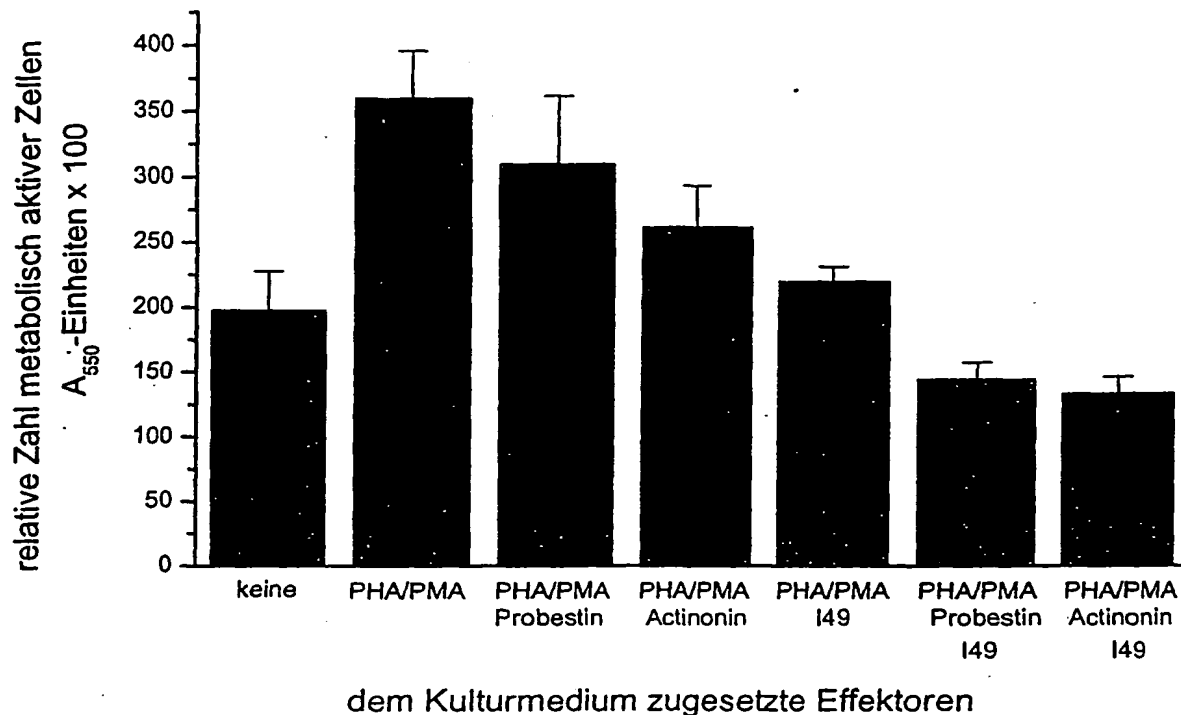


Abb. 9: Die T-Zellen wurden mit Ausnahme der unbehandelten Kontrolle durch Zugabe zum Kulturmedium von Phytohämagglutinin und Phorbol-12-myristat-13-acetat aktiviert und über einen Zeitraum von 72 h in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren einzeln sowie in Kombination inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter Verwendung des kommerziell verfügbaren WST-1 Zell-Proliferations-Assays (Takara Inc.) nach Angaben des Herstellers.

BEST AVAILABLE COPY

Beispiel 10

Hemmung der Proliferation PHA-aktivierter, humaner mononukleärer Zellen (MNZ) durch die einzelne bzw. gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der DP IV (I49 = Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid) und der X-Pro-Aminopeptidase (APP) (Apstatin).

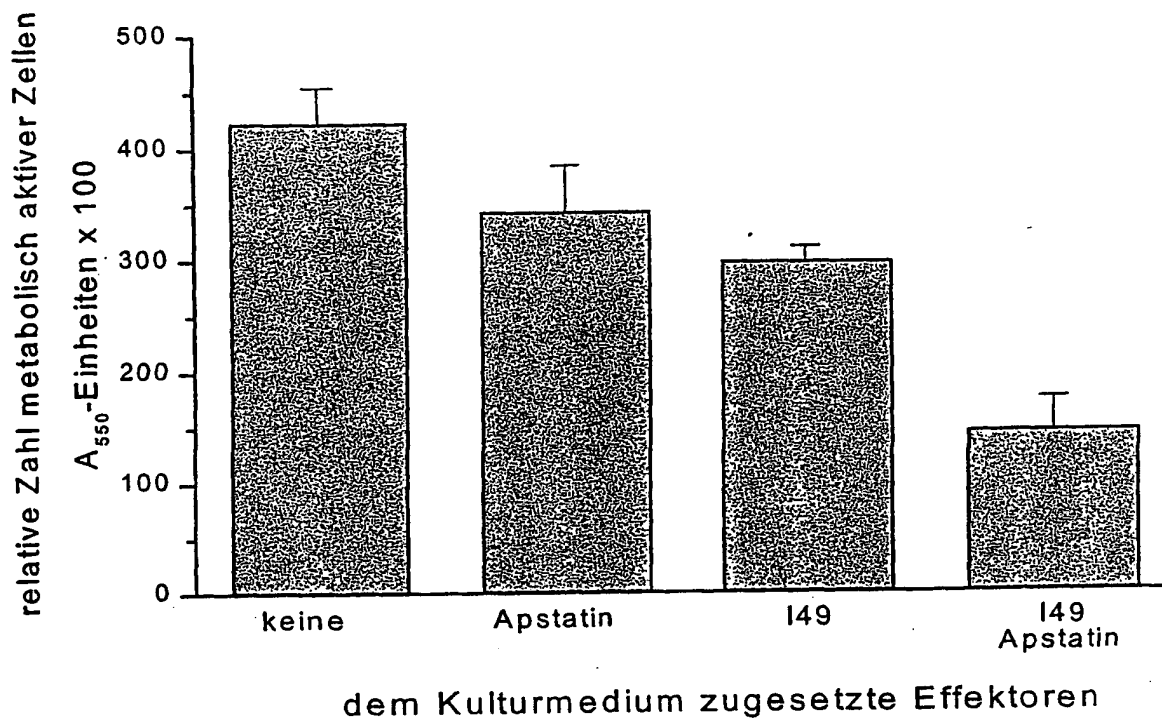


Abb. 10: Die mononukleären Zellen (MNZ) wurden über einen Zeitraum von 72 h in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren einzeln sowie in Kombination inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter Verwendung des kommerziell verfügbaren WST-1 Zell-Proliferations-Assays (Takara Inc.) nach Angaben des Herstellers.

Patentansprüche

1. Verwendung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) in Kombination mit Inhibitoren der Alanyl-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) bzw. Enzymen gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität), der X-Pro-Aminopeptidase (Aminopeptidase P, APP), des „angiotensin-converting enzyme“ (ACE) und/oder der Prolyl oligopeptidase (POP, Prolyl oligopeptidase, PEP) zur superadditiven Hemmung von Aktivierung, DNS-Synthese und Proliferation humaner T-Lymphozyten bzw. mononukleärer Zellen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Inhibitoren der DP IV bevorzugt Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa = α -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat), entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester, Dipeptidboronsäuren (z.B. Proboro-Pro) und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)_n-Peptide (Xaa = α -Aminosäure, n=0-10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze sind, wobei Xaa eine α -Aminosäure bzw. ein seitenkettengeschütztes Derivat, vorzugsweise N^ε-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z.B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren.
3. Verwendung nach Anspruch 1, worin Aminosäureamide, z.B. N^ε-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin-thiazolidid, -pyrrolidid und -piperidid sowie das entsprechende 2-Cyanothiazolidid-, 2-Cyanopyrrolidid- und 2-Cyanopiperididderivat bevorzugt als DP IV-Inhibitoren eingesetzt werden.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei als Inhibitoren der APN bevorzugt Actinoin, Leuhistin, Phebestin, Amastin, Probestin, β -Aminothiole, α -Aminophosphinsäuren, α -Aminophosphinsäurederivate, vorzugsweise D-Phe-y[PO(OH)-CH₂]-Phe-Phe und deren Salze

als Inhibitoren der APP bevorzugt Apstatin, (2S,3R)-HAMH-L-Prolin, (2S,3R)-HAPB-L-Prolin, die entsprechenden L-Prolinmethylester, (2S,3R)-HAMH-/(2S,3R)-HAPB-pyrrolidide, -thiazolidide (HAMH = 3 Amino-2-hydroxy-5-methyl-hexanoyl, HAPB = 3-Amino-2-hydroxy-4-phenyl-butanoyl) und deren Salze

als Inhibitoren des ACE bevorzugt Captopril, Enalapril, Lisinopril, Cilazopril und deren Salze

als Inhibitoren der POP (PEP) bevorzugt Postatin, Eurystatin A oder B, N^α-geschützte Peptidaldehyde, vorzugsweise Benzyloxycarbonyl-L-Prolyl-L-Prolinal bzw. Benzyloxycarbonyl-L-Thioproyl-L-Thioprolinal, N^α-geschützte Aminosäure(Xaa)-pyrrolidide bzw. -thiazolidide (Xaa = α-Aminosäure, bevorzugt L-Alanin, L-Valin, L-Isoleucin) sowie die entsprechenden 2-Cyanopyrrolidid- bzw. 2-Cyanothiazolididderivate, substratanaloge N^α-geschützte Peptidphosphonsäurediarylester bzw. Peptiddiazo-methylketone bzw. Peptidammoniummethylketone und deren Salze fungieren.

5. Verwendung von Inhibitorkombinationen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Vorbeugung und Therapie von Autoimmunerkrankungen, vorzugsweise Rheumatoide Arthritis, Lupus erythematoses, Multiple Sklerose, IDDM, Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa, Psoriasis, Neurodermitis, Glomerulonephritis, interstitielle Nephritis, Vaskulitis, autoimmune Schilddrüsenerkrankungen oder autoimmunhämolytische Anämie, sowie anderen chronischen Erkrankungen mit entzündlicher Genese wie Allergien und Arteriosklerose.
6. Verwendung von Inhibitorkombinationen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Unterdrückung von Transplantat-Abstoßung und zur Therapie von Tumorerkrankungen.
7. Pharmazeutische Zubereitungen, umfassend Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) oder DP IV-analoger Enzymaktivität in Kombination mit Inhibitoren eines der Enzyme Alanyl-Amino-peptidase (Amino-peptidase N, APN) bzw. Enzyme gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität), X-Pro-Amino-peptidase (Amino-peptidase P, APP), „angiotensin-converting enzyme“ (ACE) und Prolyl-oligo-peptidase (POP, Prolylendo-peptidase, PEP) und in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Zusatz- und/oder Hilfsstoffen.
8. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 7, umfassend als Inhibitoren der DP IV bevorzugt Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa = α-Aminosäure bzw. seitenkettengeschützte Derivate), entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphon-säurediarylester und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)_n-Peptide (Xaa = α-Aminosäuren, n=0-10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine α-Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat, vorzugsweise

N^ε-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z.B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren.

9. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 7, umfassend als Inhibitoren der DP IV vorzugsweise Aminosäureamide, z.B. N^ε-4-Nitrobenzyloxy-carbonyl-L-Lysin-thiazolidid, -pyrrolidid und -piperidid sowie das entsprechende 2-Cyanothiazolidid-, 2-Cyanopyrrolidid- und 2-Cyanopiperididderivat.
10. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 7 umfassend als Inhibitoren der APN, APP, ACE und POP (PEP), vorzugsweise Actinoin, Leuhistin, Phebestin, Amastin, Probestin, β-Aminothirole, α-Aminophosphinsäuren, α-Aminophosphinsäurederivate, bevorzugt D-Phe-y[PO(OH)-CH₂]-Phe-Phe und deren Salze als APN-Inhibitoren, Apstatin, (2S,3R)-HAMH-L-Prolin, (2S,3R)-HAPB-L-Prolin, die entsprechenden L-Prolinmethylester, (2S,3R)-HAMH- / (2S,3R)-HAPB-pyrrolidide, -thiazolidide (HAMH = 3-Amino-2-hydroxy-5-methyl-hexanoyl, HAPB=3-Amino-2-hydroxy-4-phenyl-butanoyl) und deren Salze als APP-Inhibitoren, Captopril, Enalapril, Lisinopril, Cilazopril und deren Salze als ACE-Inhibitoren, Postatin, Eurystatin A oder B, N^α-geschützte Peptidaldehyde, vorzugsweise Benzyloxycarbonyl-L-Prolyl-L-Prolinal bzw. Benzyloxycarbonyl-L-Thioprollyl-L-Thioprolinal, N^α-geschützte Aminosäure(Xaa)-pyrrolidide bzw. -thiazolidide (Xaa = α-Aminosäure, bevorzugt L-Alanin, L-Valin, L-Isoleucin) sowie die entsprechenden 2-Cyanopyrrolidid- bzw. 2-Cyanothiazolididderivate, substratanaloge N^α-geschützte Peptidphosphonsäurediarylester bzw. Peptiddiazomethylketone bzw. Peptidammoniummethylketone und deren Salze als POP (PEP)-Inhibitoren fungieren.
11. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 7 bis 10, umfassend zwei oder mehrere der Inhibitoren der DP IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität, der APN bzw. APN-analoger Enzymaktivität, des ACE, der POP (PEP) und der XPNPEP2 in räumlich getrennter Formulierung in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen zur gleichzeitigen oder zeitlich unmittelbar aufeinanderfolgenden Verabreichung mit dem Ziel einer gemeinsamen Wirkung.
12. Pharmazeutische Zubereitung gemäß Ansprüche 7 bis 11 für die systemische Anwendung zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären, rektalen, vaginalen, sublingualen Applikation zusammen mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen.

13. Pharmazeutische Zubereitung gemäß Ansprüche 7 bis 11 für die topische Anwendung in Form von z.B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln, einschließlich instilativer Applikation.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K45/06 A61P37/06 A61P35/00 A61K38/55 //(A61K38/55, 38:55)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, PASCAL, MEDLINE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STEINMETZER T ET AL: "Peptidyl ammonium methyl ketones as substrate analog inhibitors of proline-specific peptidases." JOURNAL OF ENZYME INHIBITION, (1993) 7 (2) 77-85. XP001018795 page 78, paragraph 4 page 82, paragraph 2 page 84, last line, paragraph 1 --- -/--	1,2,4-8, 10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 October 2001

Date of mailing of the international search report

13/11/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Laffargue-Haak, T

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ANSORGE S ET AL: "Membrane-bound peptidases of lymphocytes; functional implications." BIOMEDICA BIOCHIMICA ACTA, (1991) 50 (4-6) 799-807. XP001021975 page 805, last paragraph; figures 1C,,3,,4; table 3</p> <p>---</p>	1,2,4-13
X	<p>SHIMAZAWA R ET AL: "Novel small molecule nonpeptide aminopeptidase n inhibitors with a cyclic imide skeleton." JOURNAL OF ENZYME INHIBITION, (1999) 14 (4) 259-75. REF: 67 , XP001018772 * Tabellen I-V : Wirkstoffe No. 13-16, 18, 20-24, 34, 35, 40, 41, 53, 56, 58, 85 * tables I-V</p> <p>---</p>	1,2,7
Y	<p>AUGUSTYNS K ET AL: "THE UNIQUE PROPERTIES OF DIPEPTIDYL-PEPTIDASE IV (DPP IV/CD26) AND THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF DPP IV INHIBITORS" CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS BV, BE, vol. 6, no. 4, 1999, pages 311-327, XP000870290 ISSN: 0929-8673 page 314, column 2, paragraph 3 Seite 315, Verbindung No. 5 page 323, column 2, paragraph 3</p> <p>---</p>	1-3,5-13
Y	<p>REINHOLD D ET AL: "INHIBITORS OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV INDUCE SECRETION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA1 IN PWM-STIMULATED PBMC AND T CELLS" IMMUNOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, GB, vol. 91, no. 3, 1997, pages 354-360, XP000867395 ISSN: 0019-2805 cited in the application page 356, column 1, paragraph RESULTS; figure 1</p> <p>-----</p>	1-3,5-13

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K45/06 A61P37/06 A61P35/00 A61K38/55 //(A61K38/55, 38:55)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, PASCAL, MEDLINE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	STEINMETZER T ET AL: "Peptidyl ammonium methyl ketones as substrate analog inhibitors of proline-specific peptidases." JOURNAL OF ENZYME INHIBITION, (1993) 7 (2) 77-85., XP001018795 Seite 78, Absatz 4 Seite 82, Absatz 2 Seite 84, letzte Zeile, Absatz 1 --- -/--	1,2,4-8, 10

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. Oktober 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13/11/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Laffargue-Haak, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>ANSORGE S ET AL: "Membrane-bound peptidases of lymphocytes: functional implications." BIOMEDICA BIOCHIMICA ACTA, (1991) 50 (4-6) 799-807. XP001021975 Seite 805, letzter Absatz; Abbildungen 1C,,3,,4; Tabelle 3</p>	1,2,4-13
X	<p>SHIMAZAWA R ET AL: "Novel small molecule nonpeptide aminopeptidase n inhibitors with a cyclic imide skeleton." JOURNAL OF ENZYME INHIBITION, (1999) 14 (4) 259-75. REF: 67 , XP001018772 * Tabellen I-V : Wirkstoffe No. 13-16, 18, 20-24, 34, 35, 40, 41, 53, 56, 58, 85 * Tabellen I-V</p>	1,2,7
Y	<p>AUGUSTYNS K ET AL: "THE UNIQUE PROPERTIES OF DIPEPTIDYL-PEPTIDASE IV (DPP IV/CD26) AND THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF DPP IV INHIBITORS" CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS BV, BE, Bd. 6, Nr. 4, 1999, Seiten 311-327, XP000870290 ISSN: 0929-8673 Seite 314, Spalte 2, Absatz 3 Seite 315, Verbindung No. 5 Seite 323, Spalte 2, Absatz 3</p>	1-3,5-13
Y	<p>REINHOLD D ET AL: "INHIBITORS OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV INDUCE SECRETION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA1 IN PWM-STIMULATED PBMC AND T CELLS" IMMUNOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, GB, Bd. 91, Nr. 3, 1997, Seiten 354-360, XP000867395 ISSN: 0019-2805 in der Anmeldung erwähnt Seite 356, Spalte 1, Absatz RESULTS; Abbildung 1</p>	1-3,5-13